

Title	受容体遺伝子のリガンドを用いたクローニング : Tac 抗原 (p55) 内の単一のアミノ酸変異によるIL-2の結合能と抗Tac抗体反応性の解離
Author(s)	源, 誠二郎
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36058
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	みなもと 源	せい じ ろう 誠 二 郎
学位の種類	医 学	博 士
学位記番号	第 8 5 8 7	号
学位授与の日付	平 成 元 年 3 月 24 日	
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻	
	学位規則第 5 条第 1 項該当	
学位論文題目	受容体遺伝子のリガンドを用いたクローニング：Tac 抗原 (p 55) 内の 単一のアミノ酸変異による IL-2 の結合能と抗 Tac 抗体反応性の解離	
論文審査委員	(主査)	
	教 授 谷口 維紹	
	(副査)	
	教 授 岸本 進	教 授 吉川 寛

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

IL-2 受容体は活性化T細胞などのリンパ球の細胞表面上に発現され、IL-2 と結合する事により増殖シグナルを細胞内へ伝達する。ヒト IL-2 受容体として以前より抗 Tac 抗体で認識される Tac 抗原 (p55) が同定されていたが、さらに機能的な高親和性受容体を構成するには Tac 抗原に加えて p70-75 という IL-2 結合能を有する分子が必要であると示唆されている。そこで、このような IL-2 結合能を有する分子の同定を目的として、リガンドを用いた発現クローニング法を開発した。

〔方法ならびに成績〕

まず、ビオチン化 IL-2 (Bi-IL-2) とフルオレッセイン-アビジン (F1-Av) で、p55 および p70-75 を発現している YT 細胞を染色し、FACS (fluorescein activated cell sorter) で解析する事により、細胞表面上に発現された IL-2 結合分子を特異的に検出できる事を明らかにした。

そこで、この IL-2 結合分子の cDNA を同定する事を目的として、COS 細胞内で一過性の大量発現を期待できる発現ベクター CDM8 に YT 細胞由来の cDNA を挿入し、cDNA library を作成し、発現クローニングを試みた。即ち、cDNA library を COS 細胞に DEAE-dextran 法にて遺伝子導入し、72 時間後に Bi-IL-2 / F1-Av で染色し、FACS にて陽性細胞を選択分取し、この細胞から Hirt の方法により plasmid を回収するという方法を用いた。このサイクルを 1-3 回繰り返す事で、Tac 抗原 cDNA が急速に enrich される事が Southern blot 解析から明らかとなった。

次に、抗 Tac 抗体と反応しない IL-2 結合分子を同定するために、高濃度の抗 Tac 抗体の存在下で、cDNA library を導入した COS 細胞を IL-2 で染色し、上記と同様の操作を繰り返した。この結

果、IL-2 と結合出来るが、抗Tac抗体と結合し得ない蛋白をコードする2種類の cDNAを得た。抗体を用いた解析および DNA シーケンス解析から、1つはTac 抗原の Asp-4、他方は Asp-4 および Glu-9 に変異をもつ Tac variant 分子をコードする cDNA である事が明らかとなった。また IL-2 結合試験から、これらの variant 分子は intact 分子と同等の親和性で IL-2 と結合する事が示された。

〔総括〕

1) IL-2 というリガンドを用いる事で、その細胞表面受容体を検出出来る事が明らかとなった。更に、ここで用いた方法によって受容体の cDNA クローニングが可能である事が示された。この方法は、多くのリコンビナントサイトカインが利用出来る現在において、対応する細胞表面受容体の構造解析に応用出来るものと思われる。

2) 抗Tac抗体および IL-2 は Tac 抗原への結合に関して競合的に作用するにも関わらず、Tac variant の解析から両者の結合部位は区別しうる事が明らかとなった。更に、Tac 抗原の Asp-4 が抗Tac抗体との結合において重要な位置を占めている事が示唆された。

3) COS 細胞内での plasmid の mutation が高頻度におこる事を考えると、この2つの Tac variant cDNA は抗Tac抗体に反応しないという条件で多くの mutant の中から選択されたものと思われる。このように何らかの選択圧を加える事で、さらに興味ある mutant を得る事が可能であろう。

4) 今回、我々は p70-75 cDNA を得る事が出来なかった。その原因として、COS 細胞で発現された p70-75 は IL-2 に結合し得ない事、あるいは p70-75 mRNA の長さや構造の点から発現可能な cDNA を得にくい事などが考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は、リガンドを標識することによって、対応する受容体を検出する方法を開発すると共に、この方法を応用することによって、実際に受容体の遺伝子をクローンすることを可能とならしめた点で、極めて意義ある研究と考えられる。さらに、IL-2 の受容体アルファ鎖の Tac 抗体と IL-2 結合部位は、従来区別ないものと考えられていたが、本研究によって両者は区別出来ることを明らかにした。一連の成果は、今後のリガンドと受容体の解析に極めて重要と考えられ、充分博士論文として価値あるものと認める。